

Tests immunologiques pour le praticien

Que mesure-t-on ?

Quelle spécificité ?

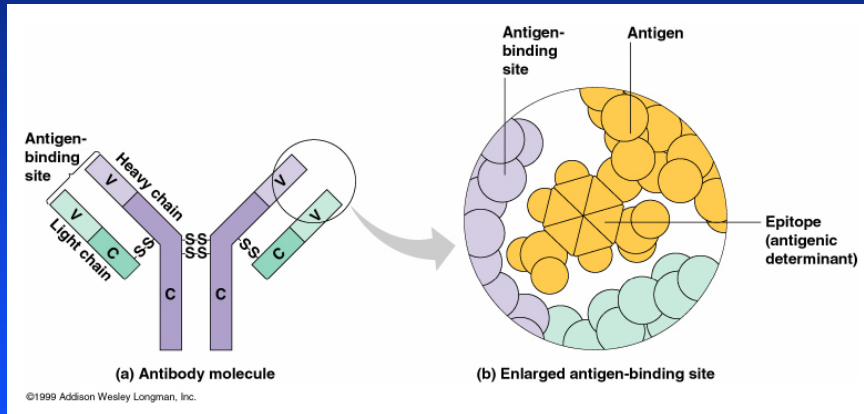
17 novembre 2011

Pascale Roux-Lombard
Laboratoire d'Immunologie et
d'Allergologie Clinique

Tests immunologiques : les auto-anticorps

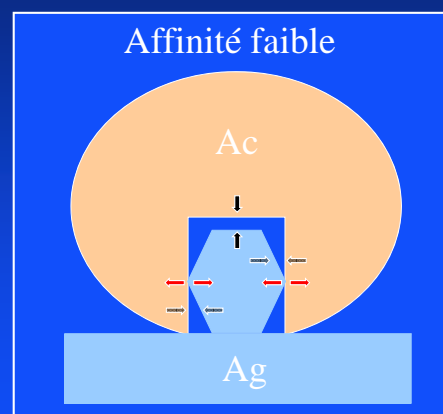
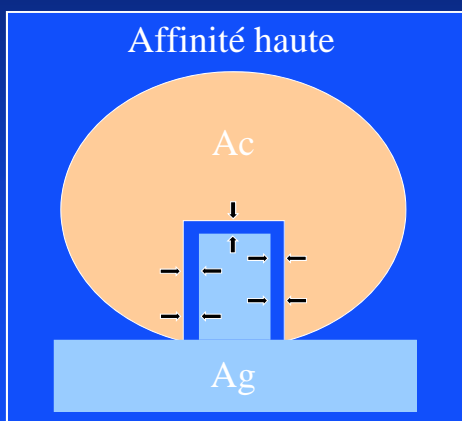
- **Que mesure-t-on ?**
 - Rappels sur les auto-anticorps
 - Méthodes de mesure

- **Quelle spécificité ?**
 - Les anti-nucléaires (ANA)
 - Les ANCA



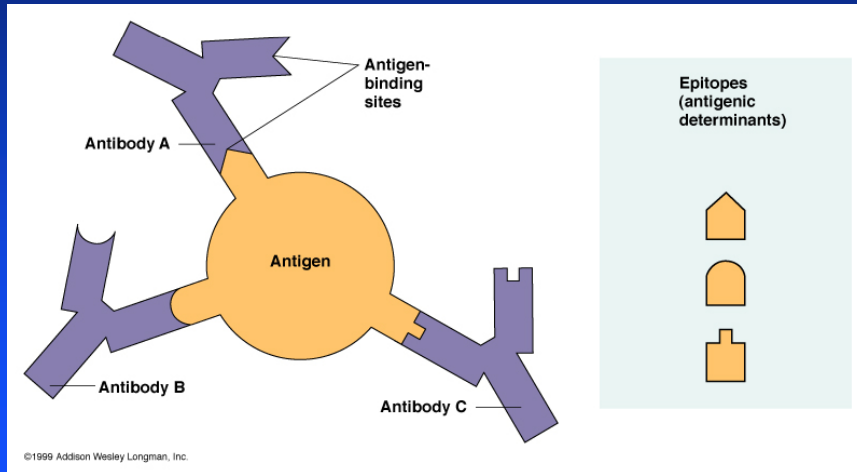
Novembre 2011

Affinité / Avidité des Ac



Novembre 2011

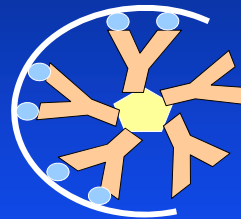
Réponse polyclonale : plusieurs épitopes d'un antigène sont reconnus par des Ac d'affinité différentes



Novembre 2011

Affinité / Avidité des Ac

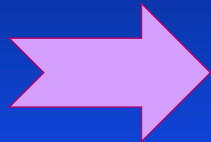
Avidité : force avec laquelle un anticorps multivalent se lie à un antigène multivalent



Affinité : $10^4 K_{eq}$ Affinité : 10^4
 Avidité : 10^4 Avidité : 10^6

Affinité : 10^4
 Avidité : 10^{10}

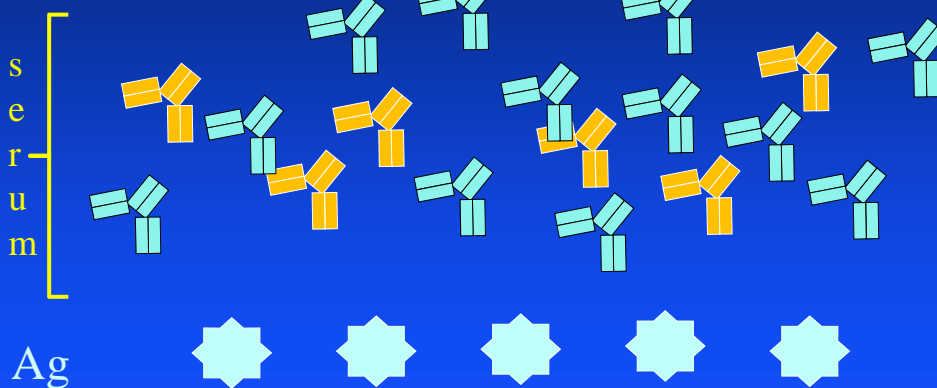
Novembre 2011



Pour un auto-Ac : un titre ou une valeur en unités ne représente pas une quantité en nombre de molécules mais résulte de la quantité ET de l'avidité

Détection des auto-anticorps Principe

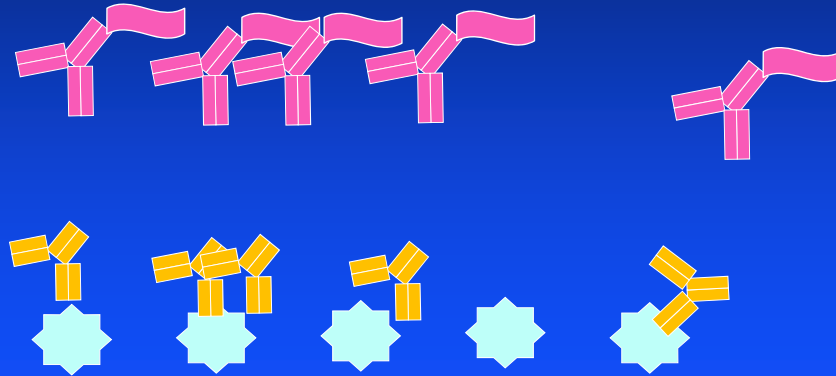
Lavages



Détection des auto-anticorps

Principe

Détection



Novembre 2011

Applications

Méthode	Substrat	Détection
Immunofluorescence indirecte	Cellules ou tissus	Fluorochrome + microscope
Elisas	Protéines ou peptides (Purifiés, synthétiques, ou recombinant) dans puits de polystyrène	Enzyme + DO
Immunoblots	Protéines ou peptides (Purifiés, synthétiques, ou recombinant) sur membrane de cellulose	Enzyme + DO
Multiplex	Protéines ou peptides Sur billes	Fluorochrome + laser

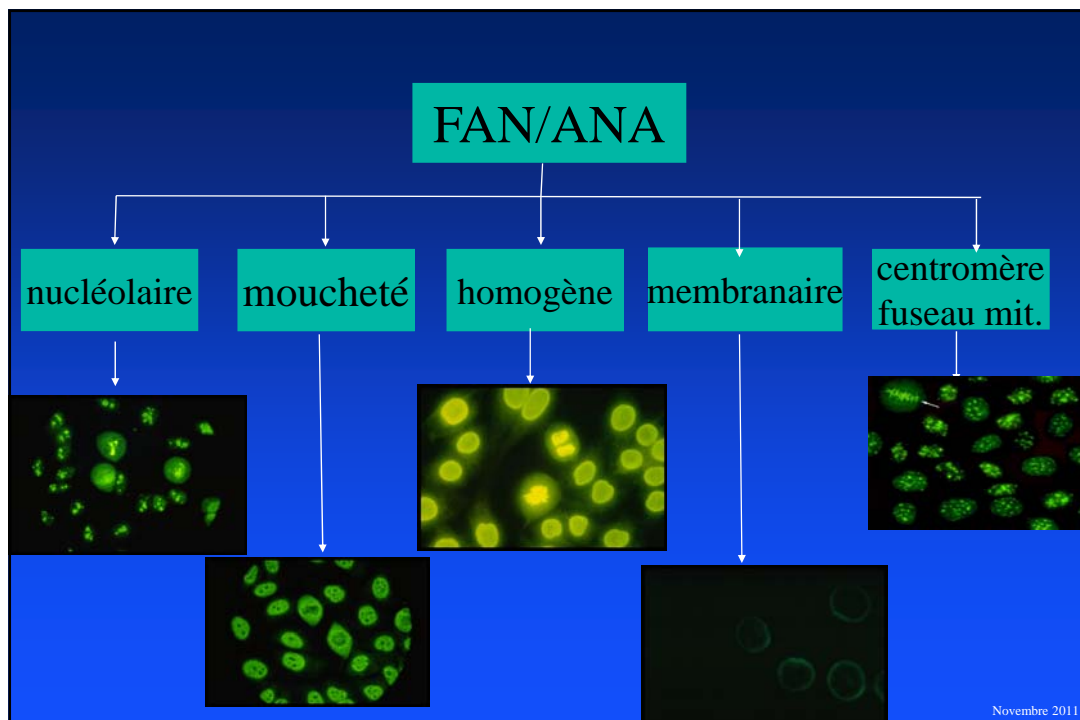
Novembre 2011

AUTO-ANTICORPS ANTI-NUCLEAIRES

Quelques définitions

- **AAN = ANA = Anticorps Anti-Nucléaires**
Auto-anticorps spécifiques pour les antigènes du noyau cellulaire, mais comprenant aussi certains Ac dirigés contre des Ag de localisation cytoplasmique
- **FAN = Facteur Anti-Nucléaire**
terme utilisé pour désigner les ANA dépistés par immunofluorescence indirecte
Substrat : cellules humaines à gros noyau (Hep-2)

Novembre 2011



Novembre 2011

ANA par IFI (FAN)

Avantages

- **Très sensible**
(sauf SSA)
- **Détection de très nombreux auto-AC**
- **Ag dans sa conformation naturelle**

Inconvénients

- **Peu spécifique**
- **Opérateur dépendant et subjectif**
- **Un aspect peut en masquer un autre**

Novembre 2011

Auto-anticorps ANA dans la population normale

Pourcentage de positivité en fonction du titre

Titre	1/10 – 1/40	1/80 – 1/160	> 1/320
% de positivité	32 %	13 %	3 %

*Adapté de EM Tan et al., « ANA in healthy individuals »
Arthritis Rheum. 1997*

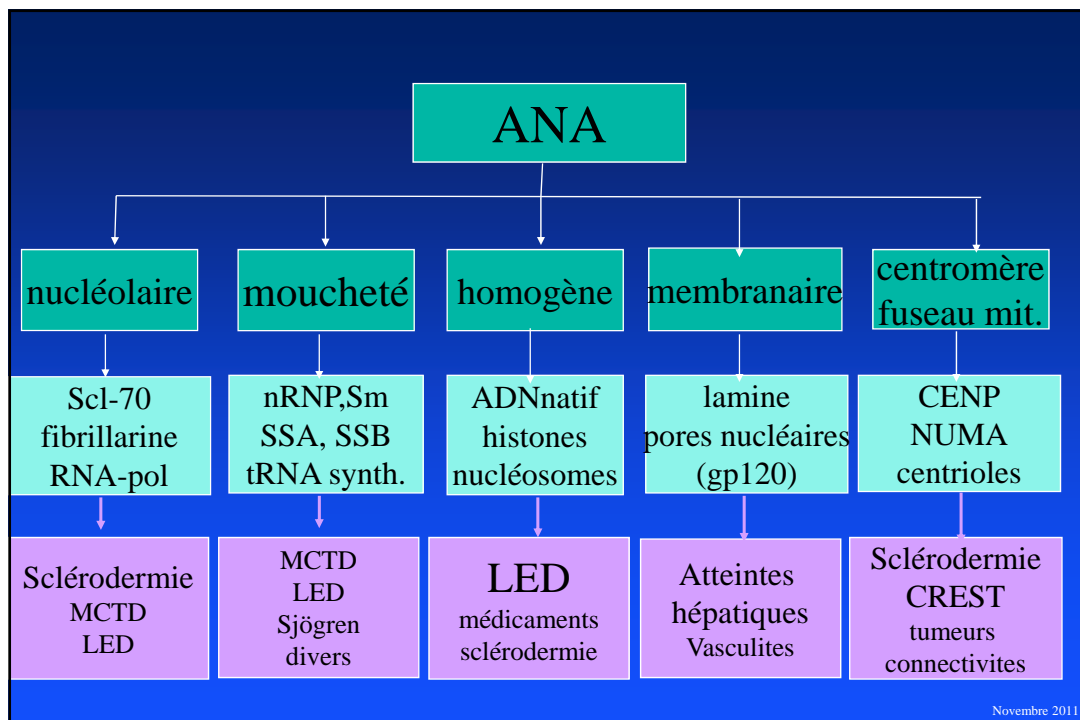
Novembre 2011

Auto-anticorps et vieillissement

Pourcentage de positivité en fonction de l'âge

Age	< 59	60-69	70-79	80-89	> 90
ANA	3 %	10 %	12 %	12 %	20 %
FR	1 %	3 %	5 %	10 %	23 %

Novembre 2011



Novembre 2011

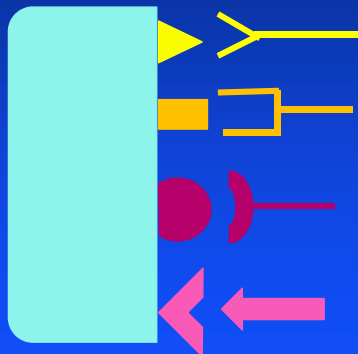
Applications

Méthode	Substrat	Détection
Immunofluorescence indirecte	Cellules ou tissus	Fluorochrome + microscope
Elisas	Protéines ou peptides (Purifiés, synthétiques, ou recombinant) dans puits de polystyrène	Enzyme + DO
Immunoblots	Protéines ou peptides (Purifiés, synthétiques, ou recombinant) sur membrane de cellulose	Enzyme + DO
Multiplex	Protéines ou peptides Sur billes	Fluorochrome + laser

Novembre 2011

Variabilité des tests : Importance du substrat

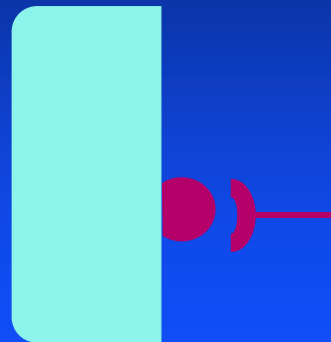
Antigène «naturel »



multiples épitopes

Ac polyclonaux

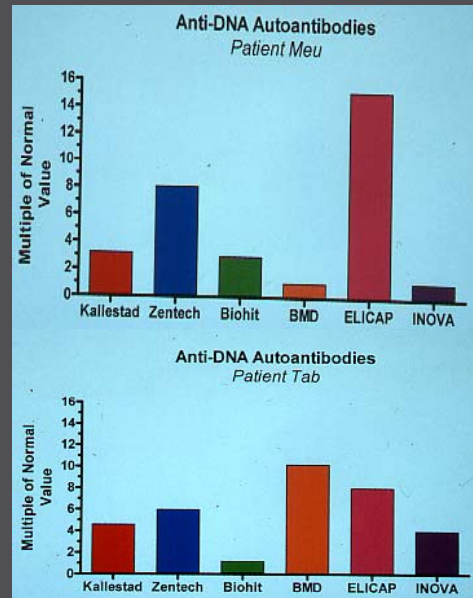
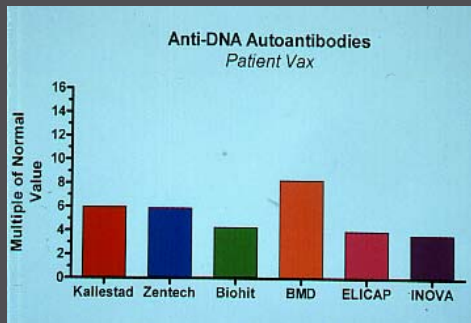
Antigène recombinant



1 seul épitope

Novembre 2011

Variabilité des tests



Pr R. Humbel, Luxembourg



Utilité clinique des ANA

■ Maladies pour lesquelles les ANA sont utiles au diagnostic

- ◆ LED (95 - 100 %)
- ◆ Sclérose systémique (Sclérodermie) (60 - 80%)
- ◆ Syndrome de Sjögren (60 - 80%)
- ◆ Hépatites auto-immunes (60 - 90%)

■ Maladies pour lesquelles les ANA sont nécessaires au diagnostic

- ◆ LED induit par médicaments (~100 %)
- ◆ MCTD (100 %)

■ Maladies pour lesquelles les ANA sont utiles au pronostic ou au suivi

- ◆ Raynaud (20 - 60 %)
- ◆ Arthrite juvénile chronique avec uvéite (20 - 50 %)

Valeur pronostique des ANA

■ Raynaud

Probabilité de développer une maladie systémique

- ✦ sans ANA : 7 %
- ✦ avec ANA : 30 %

■ Arthrite juvénile chronique avec uvéite

la positivité des ANA augmente significativement le risque d'uvéite

■ Grossesse

La présence d'anti-SSA/Ro augmente l'incidence des blocs de conduction congénitaux

Novembre 2011

ANA et atteintes spécifiques d'organes

■ LED :

- anti-ADNn et/ou anti-Sm ---> atteinte rénale
- anti-rRNP ---> atteinte SNC
- anti-SSA/Ro ---> atteinte néonatale
---> déficit C2, C4

■ Sclérodermie

- anti-Scl-70 ---> atteinte diffuse
- anti-ARN polymérase ---> atteinte rénale (moins atteinte pulmonaire)
- ANTI-U3RNP → HTAP /fibrose pulmonaire

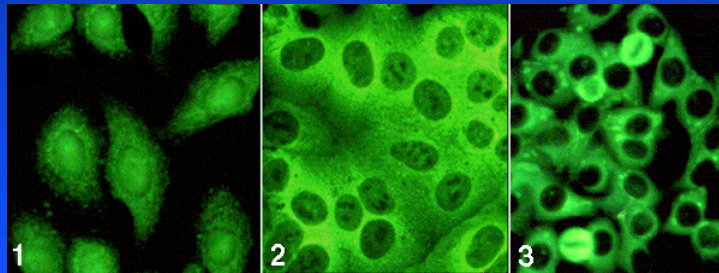
■ Polymyosite

- anti-ARNt synthétases ---> fibrose pulmonaire

Novembre 2011

Aspects cytoplasmiques

- Anti-rRNP (ribo-RNP) → LED
- Anti-SRP
- Anti-synthétase



Jo-1

PL-12

PL-7

Novembre 2011

Les anti-synthétases

- Auto-anticorps dirigés contre des enzymes impliquées dans la traduction de l'ARNm
- Enzymes : aminoacyl tRNA synthetase
 - 1 par AA

Novembre 2011

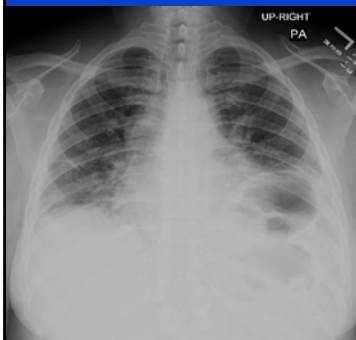
Les Ac anti-synthétases

Nom	Antigène cible	Prévalence
Anti-Jo1 (PL-1)	Histidyl-tRNA synth	20-30 %
Anti-PL-7	Threonyl-tRNA synth	~ 5%
Anti-PL-12	Alanyl-tRNA synth	~ 5%
Anti-EJ	Glycyl-tRNA synth	< 1%
Anti-OJ	Isoleucyl-tRNA synth	< 1%
Anti-KS	Asparaginylyl-tRNA synth	< 1%
Anti-Ha	Tyrosyl-tRNA synth	< 1%
Anti-Zo	Phénylalanyl-tRNA synth	< 1%

Novembre 2011

Syndrome Anti-synthétase

- Myosites (90%)
- Pneumopathie intersticielle (60%)
- Arthrites (50%)
- Raynaud (40%)
- Mains de mécanicien (hyperkeratose fissuraire) (30%)
- Fièvre (20%)



<http://www.orpha.net/data/patho/Pro/en/Antisynthetase-FRenPro8611.pdf> Septembre 2011

Anti-synthétase et atteinte interstitielle pulmonaire

- Une atteinte pulmonaire est très fréquemment associée à la présence d'ac anti-synthétase (surtout Jo-1) : 60-70%
- Parfois l'atteinte pulmonaire est isolée (amyositique)



La présence d'anti-synthétase doit faire rechercher une atteinte pulmonaire

Novembre 2011

Anti-synthétase et atteinte interstitielle pulmonaire

Table 3 Characteristics of patients with poly- and dermatomyositis with or without ILD

Characteristics	ILD present (n=11)	ILD absent (n=6)	p Value
Sex (male/female)	6/5	0/6	<0.05
Age (years), mean (SD)	57.5 (10.2)	58.7 (11.8)	NS
Time since onset of PM/DM (months), mean (SD)	3.3 (3.3)	9.5 (8.1)	<0.05
PM diagnosis, No (%)	7 (64)	2 (33)	NS
Symptoms, No (%)			
Arthritis	5 (45)	0 (0)	<0.05
Cough	5 (45)	1 (17)	NS
Dyspnoea	6 (55)	4 (67)	NS
Cough or dyspnoea	8 (73)	4 (67)	NS
Raynaud's phenomenon	2 (18)	1 (17)	NS
Dysphagia	3 (27)	2 (33)	NS
Swollen hands	3 (27)	0 (0)	NS
Laboratory tests, No (%)			
RF	6 (55)	1 (17)	NS
ANA	4 (36)	5 (83)	NS
Anti-Ro/SSA	5 (45)	1 (17)	NS
Anti-Jo-1	4 (36)	0 (0)	<0.05
Raised CK	11 (100)	6 (100)	NS
Raised ALT	8 (80)*	4 (67)	NS
Raised AST	11 (100)*	6 (100)	NS
Lung function (% predicted) mean (SD)			
VC	74.6 (16.9)†	106.0 (25.1)‡	<0.05
TLC	77.4 (18.2)†	110.7 (20.2)‡	<0.05
Tco	62.4 (7.0)†	63.0 (16.7)‡	NS

Possibilité d'atteinte interstitielle en l'absence d'anti-synthétase ?

Tous les anti-synthétase ne sont pas identifiés

D'autres auto-Ac sont associés aux atteintes pulmonaires

M Fathi et al. Ann Rheum Dis, 2004

Novembre 2011

Atteinte interstitielle pulmonaire et anti-synthétase

■ Etude rétrospective japonaise : 198 cas IIP

Anti-synthétase + : 13 (6.6%)

- EJ : 6 (3%)
- PL-12 : 3 (1.5%)
- JO-1 : 1 (0.5%)
- KS : 1; OJ:1; PL-12 : 1

La moitié des anti-synthétase + sans atteinte extra-pulmonaire



Utilité de rechercher les ac anti-synthétase dans les cas de pneumonies interstitielles idiopathiques

Wanatabe et al, *Resp Med*, 2011

Novembre 2011

Atteinte pulmonaire dans la sclérose systémique en fonction des auto-Ac

Table 3. Organ system involvement in the SSc patients with and those without anti-U3 RNP*

Organ system	With anti-U3 RNP (n = 108)	Without anti-U3 RNP (n = 2,471)	P
Peripheral vessels	107/108 (99)	2,415/2,471 (98)	NS
Joints/tendons	89/108 (82)	1,924/2,471 (78)	NS
Skeletal muscle	27/108 (25)	351/2,471 (14)	0.002
GI tract	68/82 (83)	1,475/1,883 (78)	NS
Lung	65/106 (61)	1,409/2,446 (58)	NS
Fibrosis/ILD	35/97 (36)	908/2,243 (40)	NS
PAH	27/86 (31)	239/1,823 (13)	<0.001
Heart	22/94 (23)	381/1,936 (20)	NS
Kidney	7/108 (6)	252/2,471 (10)	NS
Skin			
Skin thickening	103/108 (95)	2,320/2,471 (94)	NS
Maximum skin score, mean ± SD			
All patients	15.1 ± 12.0	15.7 ± 14.2	NS
Patients with dcSSc†	22.3 ± 9.5	27.9 ± 12.0	<0.001

Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. 2009.
Aggarwall et al., *Arthritis Rheum* 60:1112-18

Novembre 2011

Atteinte pulmonaire dans la sclérose systémique en fonction des auto-Ac

**Fibrose: U3RNP; Scl70; U1RNP, Th/T0; PM-Scl
HTAP : Th/To; U3RNP; anti-centromère**

Table 3 Organ Involvement in Patients with Scleroderma-Specific Antibodies

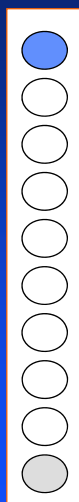
Antibody	ACA	Th/To	PmScl	U1RNP	U3RNP	TOPO	Pol 3
Number of Patients	291	72	36	71	55	318	120
Any GI (%)	57	33	39	39	59	56	37
Severe GI (%)*	8	13	0	14	25	8	5
Number with PFTs	(184)	(49)	(22)	(40)	(37)	(235)	(74)
Any Lung (%)	45	62	58	53	67	73	49
Severe fibrosis (%)*	6	16	27	22	24	23	7
Lowest FVC* (% predicted)	87	70	74	75	68	67	81
Isolated PHT (%)	19*	32*	3	14	24*	2	6
Severe heart disease (%)*	4	7	6	11	18	16	7
Renal crisis (%)*	1	4	4	7	7	10	28

*P < 0.01 by ANOVA. Major differences in bold.

Autoantibodies in Systemic Sclerosis. 2005. VD Steen. Semin Arthritis Rheum 25:35-42

Novembre 2011

Exemple de Dot-blot profil

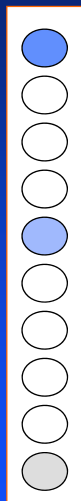


- C+
- Scl-70
- CENP-A
- CENP-B
- RNA-Pol
- U3-RNP
- PM-Scl 100
- PM-Scl75
- Th/T0
- C-

Résultat qualitatif :
Positif vs négatif
Parfois douteux

Novembre 2011

Exemple de Dot-blot profil



- C+
- Scl-70
- CENP-A
- CENP-B
- RNA-Pol
- U3-RNP
- PM-Scl 100
- PM-Scl75
- Th/T0
- C-

Résultat qualitatif :
Positif vs négatif
Parfois douteux

Novembre 2011

Utilité clinique des ANA

■ Maladies pour lesquelles les ANA ne sont PAS utiles

- | | |
|--------------------------|---------------|
| ◆ Arthrite rhumatoïde | (30-50 %) |
| ◆ Sclérose en plaque | (25 %) |
| ◆ Purpura thrombopénique | (10-30 %) |
| ◆ Atteinte thyroïdienne | (30-50 %) |
| ◆ Lupus discoïde | (5-25 %) |
| ◆ Fibromyalgie | (15-25 %) |
| ◆ Maladies infectieuses | très variable |
| ◆ Tumeurs | très variable |

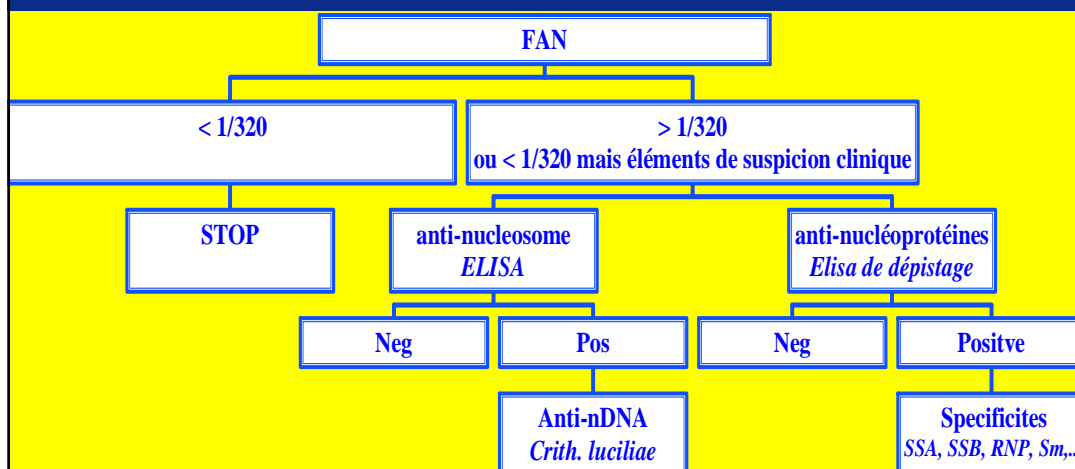
Novembre 2011

Maladies pouvant être associée à une positivité des ANA

- **Immuno-inflammatoires**
 - ◆ LED
 - ◆ MCTD
 - ◆ PR
 - ◆ Sclérodermie
 - ◆ Poly-dermatomyosite
 - ◆ Sjögren
 - ◆ Vasculites
- **Hépatiques**
 - ◆ Hépatite chronique active
 - ◆ CPB
 - ◆ Hépatite alcoolique
- **Pulmonaires**
 - ◆ Bronchite chronique
 - ◆ Fibrose idiopathique
 - ◆ Tuberculose
- **Lympho-prolifératives et autres néoplasies**
- **Infectieuses**
 - ◆ Viroses (MNI, ..)
 - ◆ Infections bactériennes chron.
- **Hématologiques**
 - ◆ Anémie hémolytique
 - ◆ Purpura thrombopénique
 - ◆ Syn. anti-PL
- **Endocriniennes**
 - ◆ Thyroïdite AI
 - ◆ Diabète AI
- **Divers**
 - ◆ Réaction médicam.
 - ◆ Phlébite récurrente
 - ◆ GN chronique
 - ◆ SEP
 - ◆ Transplantation
 - ◆ Age
 - ◆ Histoire familiale

Novembre 2011

Schéma d'orientation en présence d'ANA (FAN) positifs

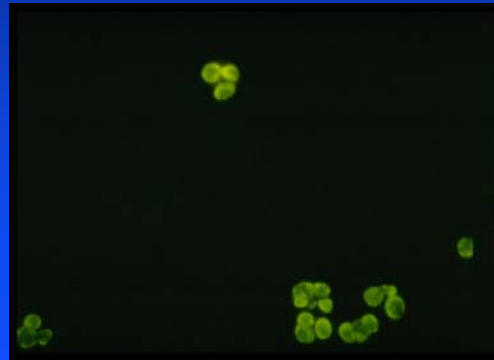
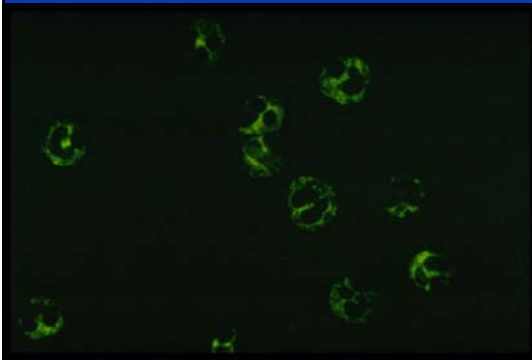


Novembre 2011

ANCA: IFI sur polynucléaires neutrophiles

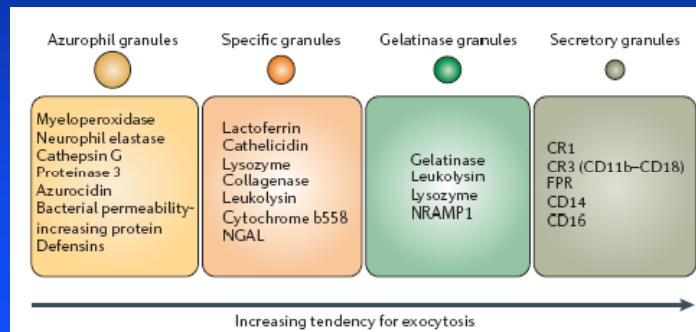
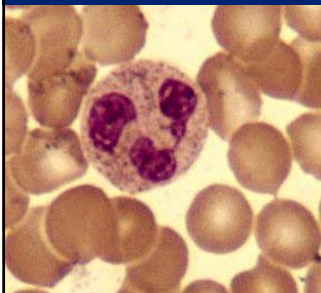
aspect cytoplasmique
(c-ANCA)

aspect périnucléaire
(p-ANCA)




Novembre 2011

PMN : contient de nombreuses granules



Pham CTN, Nature Rev Immunol, 2006

Novembre 2011



Aspect pANCA

- myeloperoxidase (MPO)
- élastase
- cathepsine G
- lysozyme
- azurocidine

Aspect cANCA

- protéinase 3 (PR3)
- BPI
- (MPO)

Autres

- glucuronidase
- gélatinase
- collagénases

Novembre 2011

Associations cliniques ANCA = vasculites ???

- C-ANCA → maladie de Wegener
- P-ANCA → autres vasculites
 - » Angéite microscopique
 - » Glomérulonéphrite progressive
 - » Churg-Strauss

Aspect IF	Antigènes cibles	Pathologies	Fréq. %	Spécif.
C-ANCA	Proteinase 3 BPI	Wegener PAN micro. GN HIV infection	50-90	élevée
P-ANCA	Myeloperoxydase Lactoferrine Elastase Cathepsine G BPI inconnu	GN Churg-Strauss PAN micro. JCA / PR PAN LED vasculites div. infections mucoviscidose	75 70 45 40 rare rare rare rare rare	modérée " " " faible " " " "
X-ANCA	inconnu	entéropathies inflam. cholangite scléro. infections	?	?

Novembre 2011

	CANCA	pANCA	cANCA + anti PR3	pANCA + anti-MPO
Sensibilité (%)				
Wegener	64	21	57	16
Churg & Strauss	10	53	-	52
PAN micro	23	58	-	67
GNPR	36	45	-	82
Spécificité (%)				
Vasculites	90	76	99	98

Adapté de Hagen, 1998 et Beauvillain, 2008

Novembre 2011

**856 patients
consécutifs du
John Hopkins**

Pour Vasculites

Table 3. Correlations between IF and ELISA tests*

Among IF+ patients	
Anti-PR3+ if cANCA+	42% (24 of 57)
Anti-MPO+ if cANCA+	7% (4 of 57)
Anti-MPO+ if pANCA+	24% (11 of 45)
Anti-PR3+ if pANCA+	4% (2 of 45)
Either anti-PR3+ or anti-MPO+	40% (41 of 102)

	IFI (c ou p-ANCA)	Elisa (MPO ou PR3)	IFI + Elisa
PPV	45 %	83 %	88 %
LR	9.4 (6.9-12.7)	54.2 (26.3-111.5)	82.1 (33.3-202.5)

*Stone JH,
Arthritis Care
& Res,2000*

Novembre 2011

Les C-ANCA sont-ils toujours des Wegener ?

■ C-ANCA, PR3 positif : très probable, mais

- Infections
 - Endocardite bactérienne subaiguë (parfois PR3 et MPO)
 - Parvovirus B19
 - HBC
- Cocaïne (souvent associé à anti-élastase → aspect mixte C-et P-ANCA)

■ C-ANCA, PR3 négatif ??

Novembre 2011

Table 4. Non-“ANCA-associated diseases” associated with positive cANCA assays (n = 28)*

Multiple sclerosis, asthma (>1:2560)†
Eosinophilia and mesenteric adenopathy (undifferentiated disease process) (1:320)
Inflammatory bowel disease (1:160)
Sjögren's syndrome (1:160)†
Dementia and aspiration pneumonia (1:160)
Cystic fibrosis (1:160)
Inflammatory bowel disease (1:80)
Idiopathic pulmonary hemosiderosis (1:80)
Post-streptococcal GN (1:80)
Alport's syndrome (1:80)
Hermansky-Pudlak syndrome (1:80)
Morbid obesity, proteinuria (1:40)
Poliomyelitis (1:40)†
HIV/HCV infection (1:40)
Idiopathic pulmonary fibrosis (1:40)
Behçet's disease (1:40)
Endocarditis (1:40)
Focal segmental GN (1:40)
Immune complex-mediated GN (1:40)
HIV nephropathy (1:40)
Viral infection with pustulo-vesicular rash (1:20)
Cocaine-induced pharyngeal necrosis (1:20)
Dilated cardiomyopathy and sinusitis (1:20)
Giant cell arteritis (1:20)
Cryoglobulinemic vasculitis (2° to HCV) (1:20)
HIV and anterior uveitis (1:20)
Idiopathic pulmonary fibrosis (1:20)
Polyarteritis nodosa (1:20)

C-ANCA

En général, titres faibles

26 PR3 –
2 PR3 + (†)

Stone JH, *Arthritis Care & Res*, 2000

Novembre 2011

ANCA et médicaments

Table 1 Medications associated with drug-induced AAV

Antibiotics
Cephotaxime
Minocycline
Anti-thyroid drugs
Benzylthiouacil
Carbimazole
Methimazole
Propylthiouacil
Anti-tumour necrosis factor- α agents
Adalimumab
Etanercept
Infliximab
Psychoactive agents
Clozapine
Thioridazine
Miscellaneous drugs
Allopurinol
D-Penicillamine
Hydralazine
Levamisole
Phenytoin
Sulfasalazine

Vasculite infra-clinique
ou seulement ANCA ?

Le plus souvent, P-ANCA

Gao Y, *Nephrology* 2009

Novembre 2011

ANCA et pathologies autres que vasculites

Infections

- HIV, HCV
- Endocardites
- Mycobactéries
- Pneumonies bactériennes
- Mucoviscidose (surinfections)
- TB

Inflammations chroniques

- PR
- Crohn, RCUH
- Syndrome de Sweet
- Collagénoses

Cancers

- Myxome oreillette
- Carcinome pulm ptes cell., rein, côlon
- Myélodysplasie

Le plus souvent P-ANCA

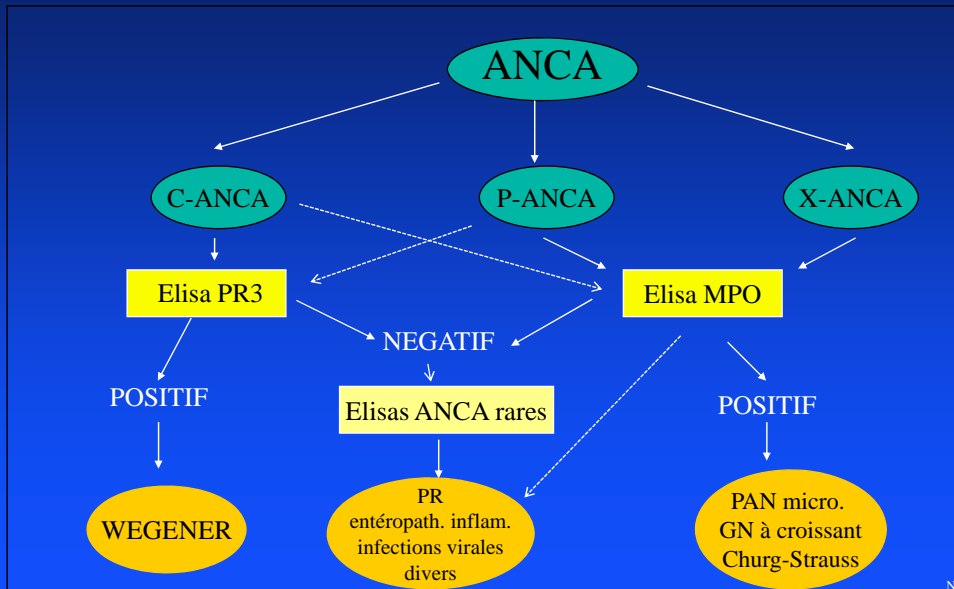
Novembre 2011

ANCA : utilité clinique

- **Diagnostic**
spécificité variable
- **Suivi de l'évolution : C-ANCA et Wegener**
 - prédiction des rechutes
 - distinction entre rechute et infection
- **Compréhension de la pathogénèse des vasculites**

Novembre 2011

Schéma d'orientation en présence d'ANCA



RESUME

- Les résultats des auto-Ac sont très dépendants de la technique utilisée
- Pour un dépistage : utilité des tests sensibles mais peu spécifiques (IFI) .
- Pour confirmation : utilité des tests spécifiques mais moins sensibles (Elisas et immunoblots)
- **Nécessité de combiner plusieurs types de tests et de connaître leurs caractéristiques**
- ❖ **En principe, un auto-Ac devrait être confirmé par au moins 2 méthodes**